



**UDESC**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE E  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE  
*Escherichia coli* PROVENIENTES DE CARNE DE FRANGO**

**REGIANE BOARETTO CRECENCIO**

CHAPECÓ, 2018

**REGIANE BOARETTO CRECENCIO**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE E  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*  
PROVENIENTES DE CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

**Orientadora: Prof. PhD Lenita Moura Stefani**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva**

Chapecó, SC, Brasil

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Crecencio, Regiane Boaretto

Caracterização genotípica de patogenicidade e  
resistência antimicrobiana de isolados de  
Escherichia coli provenientes de carne de frango  
/ Regiane Boaretto Crecencio. - Chapecó, 2018.  
63 p.

Orientadora: Lenita Moura Stefani

Co-orientador: Aleksandro Schafer da Silva  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do  
Oeste, Programa de Pós-Graduação, Chapecó, 2018.

1. afa/dra. 2. Biofilme. 3. ESBLs. 4.  
Escherichia coli. I. Stefani, Lenita Moura. II.  
Schafer da Silva, Aleksandro. , .III.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de  
Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação  
. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina  
UDESC Oeste  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

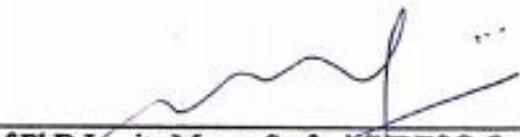
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE E  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*  
PROVENIENTES DE CARNE DE FRANGO**

Elaborada por  
**Regiane Boaretto Crecencio**

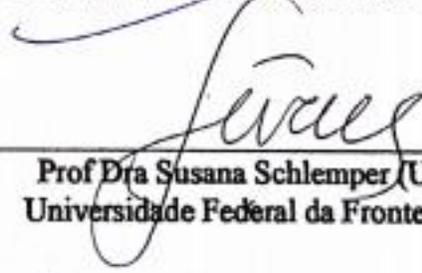
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

**Comissão Examinadora:**



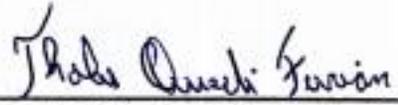
---

**Prof Ph.D. Lenita Moura Stefani (UDESC-Oeste)  
Universidade Estadual de Santa Catarina**



---

**Prof. Dra. Susana Schlemper (UFFS)  
Universidade Federal da Fronteira Sul**



---

**Dr. Thales Quedi Furian (UFRGS)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Chapecó, 05 de fevereiro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Ao meus pais, Assis e Celia, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas. Isso só me fortaleceu e me fez dar o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu noivo, Lucas, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, habilidades laboratoriais, alegria e amor, este trabalho pode ser concretizado.

A minha orientadora, Prof. PhD. Lenita Moura Stefani, por toda paciência, amizade, dedicação, ensinamentos e tempo desprendido. Obrigada por acreditar em meu potencial e me fazer evoluir cada vez mais!

A toda equipe do LABMIM sempre disposta. Obrigada pelo companheirismo e pela amizade.

A meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, especialmente à Maiara e Jéssica Giuriatti, que se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve o meu trabalho. Aos poucos nos tornamos mais que amigas, quase irmãs. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e sempre estarem presentes. Vocês foram presentes na minha vida!

Agradeço a UFRGS, especialmente a toda equipe do CDPA pela parceria firmada.

Agradeço a UFFS, minha universidade mãe, pela autorização de uso dos equipamentos, especialmente a Prof. Dr. Susana Regina Schlemper pela confiança e apoio em todos os momentos.

Agradeço, também, à CAPES e a FAPESC pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer à Programa de Pós Graduação em Zootecnia e a Universidade Estadual de Santa Catarina por capacitarem um ambiente de aprendizagem e fazerem parte de minha formação.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE PATOGENICIDADE E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE CARNE DE FRANGO

AUTORA: Regiane Boaretto Crecencio  
ORIENTADORA: Prof PhD Lenita Moura Stefani  
Chapecó, 05 de fevereiro de 2018.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente a patogenicidade, o perfil de resistência antimicrobiana, além da capacidade de produzir biofilmes de isolados de *Escherichia coli* provenientes de cortes de carne de frango *in natura* comercializados no município de Chapecó, SC no período de fevereiro de 2016 a agosto de 2017 provenientes das principais empresas do setor avícola brasileiro. Para isso, 150 amostras oriundas das principais empresas avícolas do Brasil foram coletadas e procedeu-se o isolamento de *E. coli*, seguido do antibiograma com os antimicrobianos: amoxicilina associado ao ácido clavulânico (20/10 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), trimetoprima + sulfametoxazol (1,25/23,75 µg). Além do teste de disco aproximação, que é indicador da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), e da avaliação da capacidade de formação de biofilmes de todas as cepas isoladas, avaliou-se ainda, a presença de genes ESBLs nas cepas produtoras de ESBLs (*bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC*) e os genes de adesinas relacionados à patogenicidade e formação de biofilme (*sfa/foc*, *afa/draB*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *tsh*, *papC*, *mat*, *crl*, *felA*, *fimH* e *papG*) que foram avaliados nas cepas consideradas fortemente formadoras de biofilme. *E. coli* foi isolada em 58,66% das amostras, sendo que a marca A apresentou maior percentual (70%) de isolados positivos, seguidas das marcas D, B e C com 60, 53,3 e 50%, respectivamente. O maior perfil de resistência observado foi para a classe dos beta-lactâmicos com 39,5% de resistência, seguido de sulfonamida (36,9%) e polimixina (33,4%). Dos isolados obtidos, 77% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, onde a marca A apresentou o maior percentual geral de resistência com 95,23% seguida pela marca C (80%), B (75%) e D (69,44%), onde 36,3% destes isolados foram multirresistentes. A produção de ESBLs foi detectada em 17,04% (15/88) das cepas de *E. coli* e 70,44% eram capazes de formar biofilme de forma moderada a forte. O gene *bla*TEM-1 foi o mais prevalente (73,33% - 11/15), seguido do gene *bla*SHV-1 (46,66%), e do *bla*CMY-2 (6%). Das 31 amostras fortemente formadoras de biofilme, 26 (83,87%), 24 (77,41%) e 20 (64,51%) apresentaram os genes *fimC*, *papG* e *crl*, respectivamente. Ainda foram encontrados os genes *hrla* (6), *mat* (6), *tsh* (4), *papC* (1) e *afa/dra* (1), sendo este o primeiro relato da existência do gene *afa/dra* em carnes brasileiras. Este estudo demonstrou que *E. coli* oriundas de carne *in natura* de frango possuem um perfil de resistência e patogenicidade importantes do ponto de vista de saúde pública, uma vez que além de serem produtoras de ESBLs são também produtoras de biofilmes, albergando um repertório genético que favorece a sua permanência em plantas frigoríficas e o aparecimento de doença no homem e nos animais.

**Palavras-chave:** Adesinas, Biofilme, ESBLs, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Animal Science Graduate Program  
Universidade do Estado de Santa Catarina

# GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF PATHOGENICITY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM CHICKEN MEAT

AUTHOR: REGIANE BOARETTO CRECENCIO  
ADVISOR: PROF. PhD LENITA MOURA STEFANI  
February 5<sup>th</sup>, 2018  
Chapecó, SC Brazil

The aim of this work was to characterize the antimicrobial resistance profile, to detect genes of pathogenicity, as well as the capacity to form biofilm in *E. coli* isolated from broiler meat commercialized in the municipality of Chapecó, SC, from February 2016 to August 2017. For this, 150 samples from the main poultry companies in Brazil were collected and *E. coli* isolates were tested against the following antimicrobials: amoxicillin associated with clavulanic acid (20/10 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), trimethoprim + sulfamethoxazole (1.25 / 23.75 µg), in addition to the disk approximation test, an indicator of the production of extended spectrum betalactamases (ESBLs). In addition, we evaluated the ability to form biofilm, and the presence of ESBLs genes (*bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 and *AmpC*) and adhesin genes related to pathogenicity and biofilm formation (*sfa/foc*, *afa/draB*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *tsh*, *papC*, *mat*, *crA*, *felA*, *fimH* and *papG*) for the strains detected as strongly biofilm producers. A total of 58.66% of resistance was found with the brand A showing the highest percentage (70%) of *E. coli*, followed by the brands D, B and C with 60, 53.3 and 50% respectively. The highest resistance profile was observed for the beta-lactam class with 39.5% resistance, followed by sulfonamide (36.9%) and polymyxin (33.4%). Of the isolates, 77% were resistant to at least one antimicrobial, where the A mark had the highest overall percentage of resistance with 95.23% followed by the mark C (80%), B (75%) and D (69,44 %). We also found that 36.3% of these isolates were multiresistants. The production of ESBLs was detected in 17.04% (15/88) and 70.44% were able to form biofilm in a moderate to strong manner. The *bla*TEM-1 gene was the most prevalent (73.33% - 11/15), followed by the *bla*SHV-1(46.66%), and *bla*CMY-2 (6%). Out of the 31 strongly biofilm forming *E. coli*, 26 (83.87%), 24 (77.41%) and 20 (64.51%) showed *fimC*, *papG* and *crl* genes, respectively. The *hrla* (6), *mat* (6), *tsh* (4), *papC* (1) and *afa/dra* (1) genes were still found, and this is the first report of the existence of the *afa/dra* gene in Brazilian broiler meat. This work demonstrates that *E. coli* derived from fresh chicken meat has an important profile of resistance and pathogenicity, due to its ability to produce ESBLs and biofilms, indicating a genetic repertoire that favors its permanence in slaughterhouses and the appearance of disease in man and animals.

**Keywords:** Adesins, Biofilm, ESBLs, *Escherichia coli*.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>10</b>
1.1	A CARNE de frango no Brasil e o risco zoonótico da <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	10
1.1.1.1	Patotipos de <i>E. coli</i> .....	11
1.1.1.2	Caráter zoonótico da <i>E. coli</i> .....	13
1.2	Resistência bacteriana .....	14
1.2.1	Resistência bacteriana a beta-lactâmicos .....	16
1.2.2	ESBLs .....	17
1.3	Biofilmes .....	20
1.3.1	Risco dos biofilmes à indústria .....	21
1.3.2	Genes de adesinas e biofilme .....	24
1.4	Objetivos .....	25
1.4.1	Objetivo geral: .....	25
1.4.2	Objetivos específicos: .....	25
<b>2.</b>	<b>MANUSCRITO OU ARTIGO I .....</b>	<b>26</b>
<b>1.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>4</b>
2.1	Isolamento de <i>E. coli</i> em cortes de carne de frango .....	4
2.2	Teste de disco-difusão .....	5
2.3	Teste de disco-aproximação .....	5
2.4	Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) .....	6
2.5	Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) .....	6
2.6	Teste de Formação de Biofilme .....	6
2.7	Pesquisa de Genes de Resistência Relacionados a ESBLs .....	7
2.8	Pesquisa de genes de adesinas relacionados a produção de biofilme .....	9
2.9	Eletroforese .....	9
2.10	Análise estatística .....	10
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>11</b>
3.1	Isolamento de <i>E. coli</i> em cortes de carne de frango .....	11
3.2	Teste de disco-difusão .....	11

3.3	Teste de disco-aproximação .....	12
3.4	Resistência a múltiplas drogas (MDR) e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA).....	13
3.5	Teste de formação de biofilme .....	14
3.6	Pesquisa de genes de resistência relacionados a ESBLs .....	14
3.7	Pesquisa de genes de adesinas relacionados a produção de biofilme .....	15
<b>4.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>16</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>19</b>
	<b>Referências utilizadas no artigo.....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>

# 1. CAPÍTULO I

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 A CARNE DE FRANGO NO BRASIL E O RISCO ZONÓTICO DA *Escherichia coli*

Com um consumo *per capita* anual de 43,25 kg e a crescente demanda da carne de frango, o Brasil destaca-se na produção e exportação deste produto. Nosso país hoje é o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango, perdendo apenas para os Estados Unidos (Associação Brasileira de Proteína Animal, 2017). O Estado de Santa Catarina destaca-se nesta produção, sendo o segundo maior produtor e exportador de carne de frango do país. Em 2016, as exportações desta carne superaram um milhão de toneladas destinadas a mais de 140 países. A avicultura tem o maior valor bruto da produção agropecuária catarinense, com um faturamento de 7,1 milhões de reais em 2016 (Associação Brasileira de Proteína Animal, 2017; BRASIL, 2017).

Com o crescimento da produção animal, aumenta a preocupação com os aspectos sanitários, e com isso, o aprimoramento tecnológico deve estar associado à evolução nas pesquisas relacionadas a sanidade das aves e a segurança alimentar (DE SALES SOUZA et al., 2016). A carne de frango é classificada como um alimento saudável, sendo indicada para o consumo em todas as idades. É uma fonte importante de proteínas de origem animal de baixo custo, rica em aminoácidos indispensáveis, ferro e vitaminas do grupo B, principalmente, B2 e B12. Porém, quando *in natura*, a carne de frango pode servir como um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, como por exemplo, a *Escherichia coli* (SOUZA, 2016).

#### 1.1.1 *Escherichia coli*

*E. coli* é uma bactéria Gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, geralmente móvel, apresenta flagelos peritríquios, sendo frequentemente fimbriada. Por ser fermentadora de lactose, produz colônias cor rosa em ágar MacConkey, e algumas linhagens produzem colônias com brilho metálico quando crescem em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (QUINN et al., 2005). Outras características que auxiliam a identificação deste microrganismo são a reação positiva para indol, testes negativos para a produção de urease e H<sub>2</sub>S e a não utilização do citrato como única fonte de carbono (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Estas bactérias podem ainda ser sorotipadas pelo uso de seus antígenos, sendo eles o somático (O), de natureza lipopolissacarídica localizado na superfície da parede celular, o flagelar (H), de origem proteica, e os fimbriais (F), que agem como adesinas, facilitando a aderência na superfície das mucosas (QUINN et al., 2005). Quando abordamos o assunto da existência de vários sorotipos de *E. coli*, apenas um limitado número deles está associado com doenças no homem e animais (SOJKA, 1971). Sendo assim, podemos dizer que a especificidade sorológica dos antígenos O é baseada na estrutura complexa da cadeia polissacarídica presente na parede celular. Estes antígenos são termoestáveis, ou seja, não são inativados em temperaturas de 100 °C ou 121 °C. Na maioria dos laboratórios, a determinação do antígeno O é realizada através da soroaglutinação em lâmina. O antisoro é produzido em coelhos inoculados com suspensões de antígenos aquecidos (100 °C ou 121 °C) (SOJKA, 1965).

Os antígenos H são numerados de H1 a H49 e H51 a H56, e como podem ocorrer em associação com qualquer antígeno O, a sua determinação é importante em levantamentos epidemiológicos para estabelecer a patogenicidade das cepas de *E. coli* envolvidas em doenças intestinais e extraintestinais (LIOR, 1994).

#### **1.1.1.1 Patotipos de *E. coli***

Algumas cepas possuem capacidades distintas, sendo patogênicas, e podendo levar os indivíduos infectados à morte (GIRÃO et al., 2006). Ao discutir a diversidade de formas patogênicas desta espécie bacteriana, é possível classificar a *E. coli* em grupos com um modo semelhante de patogênese e que causam formas de doenças clinicamente similares, consideradas como sendo oriundas de um mesmo clone patogênico, onde bactérias dentro de uma espécie compartilham semelhanças por terem sido produzidas de uma célula ancestral comum (DONNENBERG; WHITTAM, 2001). Algumas patologias associadas à *E. coli*, como doenças extraintestinais (cistite, septicemia e meningite) e gastrointestinais, podem estar relacionadas com a presença de genes responsáveis pela codificação de características que conferem virulência ao microrganismo (GIRÃO et al., 2006).

Baseando-se nos fatores de virulência, as bactérias são classificadas em patotipos (CROXEN; FINLAY, 2010). Existem pelo menos oito patotipos reconhecidos de *E. coli*, e além destes, muitos clones patogênicos distintos. As bactérias do mesmo clone patogênico representam um ramo monofilético de uma árvore evolutiva e tipicamente carregam muitos dos mesmos

elementos genéticos móveis, incluindo aqueles que determinam a virulência (DONNENBERG; WHITTAM, 2001).

Dentre os oito patótipos, a ETEC (*E. coli* enterotoxigênica) pode infectar os seres humanos e animais de produção, como os suínos. Nos humanos, esta bactéria é a principal causadora de diarreia em adultos e crianças nos países em desenvolvimento (ROUSSEL et al., 2017). As cepas de ETEC assemelham-se ao *Vibrio cholerae*, pois aderem à mucosa do intestino delgado através de fímbrias superficiais (pili tipo 1 e antígenos do fator de coagulação) e produzem sintomas relacionados com a produção de duas enterotoxinas, a toxina termo-lábil (LT) e a toxina termo-estável (ST), que agem nas células da mucosa intestinal causando diarreia. A infecção por este microrganismo ficou conhecida também como diarreia dos viajantes, sendo que investigações epidemiológicas sugerem que alimentos e água contaminados são os veículos mais comuns de infecção (MENG; FENG; DOYLE, 2001).

O patótipo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ficou reconhecido como um importante patógeno em 1983, quando a bactéria de sorotipo O157:H7 foi vinculada a doenças alimentares de um surto ocorrido pela ingestão de hambúrguer mal cozido em restaurantes nos Estados Unidos (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006). A bactéria *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC), ou também conhecida como *E. coli* produtora de shiga-toxina (STEC), é um importante agente de zoonose de origem alimentar e está associada a sérios problemas de saúde pública, uma vez que, quando infecta humanos causa sérios quadros de colite hemorrágica, podendo estar associada ainda a dores abdominais, diarreia hemorrágica, assim como ao desenvolvimento de síndrome urêmica hemolítica (NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

Ligada principalmente à diarreia em crianças pequenas, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) tem um fenótipo característico na capacidade de produzir lesões anexas e afastadas (*attaching and effacing*), onde as bactérias ligam-se firmemente à membrana da célula hospedeira causando ruptura da superfície celular, levando ao desmembramento das microvilosidades e tendo como principais sinais clínicos a diarreia aquosa e vômitos (OCHOA; CONTRERAS, 2011).

A *E. coli* patogênica para aves, ou APEC, é a principal causa mundial de perdas econômicas na indústria avícola devido à morbidade, mortalidade e diminuição da produção, pondo em risco uma das fontes mais baratas e de alta qualidade de proteína do mundo (HUSSEIN et al., 2013). Segundo Johnson et al. (2008), uma vez que as estirpes de *E. coli* extraintestinais (ExPEC) de hospedeiros humanos e aviários enfrentam desafios semelhantes ao estabelecer

infecções em locais extraintestinais, podem também compartilhar conteúdos semelhantes de genes de virulência e capacidades para causar doença.

A *E. coli* é uma das primeiras bactérias a colonizar o intestino das aves, sendo considerada desejável, uma vez que a presença deste agente no intestino das aves exerce um efeito protetor contra a colonização por bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp. A bactéria atua como parte da microbiota intestinal e auxilia nos processos de digestão de alimentos e na síntese e absorção de alguns nutrientes. Amostras comensais raramente estão relacionadas aos quadros de doenças entéricas, e quando isto acontece, pode-se supor que o hospedeiro apresente algum grau de imunossupressão ou que exista alteração dos mecanismos locais de proteção do trato gastrointestinal (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Segundo os mesmos autores, contudo, alguns destes microrganismos que afetam aves podem ser considerados patogênicos, e neste caso a infecção pode ser relacionada à manifestação de vários sinais clínicos extraintestinais como onfalite, doença respiratória, salpingite, celulite, síndrome da cabeça inchada e colisepticemia. Aproximadamente 15 a 20% das amostras podem ser consideradas potencialmente patogênicas por possuírem determinantes antigênicos capazes de causar doenças tanto nos animais como nos homens.

#### **1.1.1.2 Caráter zoonótico da *E. coli***

As amostras de *E. coli* de origem aviária e as oriundas de infecções extraintestinais em humanos podem apresentar perfil de virulência semelhante, não podendo ser distintas filogeneticamente ou em ensaios *in vivo*. Estirpes humanas podem causar infecções em aves, assim como estirpes de origem aviária podem causar infecções em modelos experimentais com mamíferos, reforçando a possibilidade de um potencial zoonótico (KNÖBL et al., 2013).

As bactérias patogênicas em aves são uma ameaça tanto para a indústria avícola quanto para a saúde humana, devido à diminuição da produção e/ou transmissão aos consumidores através de produtos de aves contaminados. Tanto a carne como os ovos são conhecidos por serem uma fonte de agentes patogênicos humanos, tais como *Campylobacter* spp., *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. Estes produtos, quando inspecionados e considerados contaminados com estes microrganismos, são por vezes recolhidos, caso o limite recomendado para a carga microbiana máxima seja diferente daquele estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA). Estudos recentes têm sugerido que as carnes também podem ser uma fonte de transmissão da estirpe *E. coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) para os seres humanos (MITCHEL et al., 2015).

O risco zoonótico dos isolados de APEC foi relacionado inicialmente as semelhanças filogenéticas entre alguns ExPEC humanos e aviários, sendo que além destas semelhanças, estes ainda compartilham alguns genes de virulência. Interessantemente, a comparação de um grande número de ExPEC de doenças humanas e de frangos a partir do seu antecedente filogenético e da presença de genes associados à virulência demonstrou que, embora a maioria dos isolados enquadre-se em genes distintos (*E. coli* patogênica para aves (APEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC)), com características diferenciáveis, um *cluster* de genotipagem que inclui ExPEC com traços sobrepostos foi considerado potencialmente zoonótico (JOHNSON et al., 2008).

A hipótese que alimentos, em particular produtos de origem avícola, podem atuar como reservatórios de ExPEC humanos é derivada de várias evidências genéticas, entre elas relações genéticas entre APEC e ExPEC, já que estudos experimentais demonstraram o potencial patogênico da APEC em modelos de animais mamíferos e o potencial da ExPEC de origem humana em modelos aviários, e ainda dados epidemiológicos moleculares que demonstram relações genéticas entre cepas isoladas de infecções humanas e de carne de aves (MANGES, 2016). Este fato é preocupante, uma vez que cepas zoonóticas carregam também genes de resistência. Em um estudo realizado na Noruega, sugeriu-se que houve a transferência de genes de resistência as cefalosporinas da carne de frango para humanos, levando a dificuldades no tratamento de pessoas, sendo estas cepas de *E. coli* fonte de plasmídeos de resistência à patógenos oportunistas na microbiota humana (BERG et al., 2015).

## 1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* serem consideradas bactérias comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, as cepas patogênicas podem causar diferentes infecções intestinais e extraintestinais por serem facilmente encontradas no meio ambiente, em alimentos e existirem em grande quantidade (SHIN et al., 2015). O uso de antimicrobianos de maneira preventiva e como promotores de crescimento em animais de produção tem atraído inúmeros

debates, pois, a microbiota intestinal desses animais pode ser uma fonte de infecção para os seres humanos, principalmente de patógenos entéricos como *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, entre outros (SINGER et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca os riscos causados à saúde pública pela resistência a importantes antimicrobianos de espectro estendido, como cefalosporinas, fluoroquinolonas e carbapenemos (WHO, 2014). Isso se deve a redução na eficácia dos antibióticos utilizados no tratamento de infecções comuns ter se acelerado nos últimos anos (LAXMINARAYAN et al., 2013). Estima-se que cerca de 25.000 pessoas morrem a cada ano na Europa por infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos (LAMBERT et al., 2011). Nos EUA, 19.000 mortes foram associadas com infecções invasivas ocasionadas por MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina) (KLEVENS et al., 2007). De acordo com WOODFORD et al. (2014), as preocupações são aumentadas quando a resistência ocorre em animais de produção, onde há maior risco de transmissão aos seres humanos pela cadeia alimentar e meio ambiente.

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* ser considerada comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, as cepas patogênicas podem causar diferentes infecções intestinais e extraintestinais por serem facilmente encontradas no meio ambiente e em alimentos (SHIN et al., 2015).

Pode ocorrer resistência bacteriana aos antibióticos a partir de mutações genéticas e da pressão seletiva microbiana ocasionada pela vantagem competitiva de cepas resistentes a determinados antimicrobianos, onde os genes de resistência podem estar situados no cromossomo bacteriano, bem como em elementos extracromossomais transmissíveis, como os plasmídeos (LAXMINARAYAN et al., 2013).

Para facilitar a transmissão de genes que codificam resistência aos antimicrobianos, as bactérias possuem elementos genéticos móveis, também chamados de elementos transponíveis. Na década de 70, muitos casos de multirresistência foram associados com plasmídeos transmissíveis (STOKES; HALL, 1989). Os plasmídeos são moléculas circulares duplas de DNA capazes de replicar-se independentemente dos cromossomos, cujo tamanho pode variar entre dezenas a milhares de kilobases (MARTÍNEZ et al., 2016). Podem ser passados de uma bactéria para outra por transferência horizontal de genes, proporcionando uma vantagem seletiva, como a resistência aos antibióticos (CARATTOLI, 2013), conferindo resistência para as principais

classes de agentes antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrolídeos e quinolonas (CARATTOLI, 2009).

Além dos plasmídeos, os transposons também possuem a habilidade de mover-se dentro do genoma bacteriano. A transposição de genes para diferentes sítios do genoma é considerada uma das principais formas de rearranjo do DNA bacteriano, podendo modificar a expressão desses genes (BENNETT, 2008). Devido ao crescente aumento na resistência bacteriana aos antimicrobianos, diversos elementos móveis foram descobertos, como por exemplo, os já citados plasmídeos e transposons. Mas, estudos comparativos destes componentes resultaram na descoberta dos integrons (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2002) que são elementos genéticos considerados sistemas naturais de clonagem, capazes de incorporar ORFs (quadros de leitura abertos) por recombinação de sítio específico e convertê-los em genes funcionais (cassetes gênicos), garantindo a expressão correta inclusive de genes de resistência (MAZEL, 2006).

### **1.2.1 Resistência bacteriana a beta-lactâmicos**

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são agentes que constituem a primeira classe de produtos naturais utilizados no tratamento de infecções bacterianas, pois inibem a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptideoglicanos da parede da célula bacteriana e este grupo de antimicrobianos engloba as penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e alguns inibidores de beta-lactamases e são amplamente utilizados devido sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade. Possuem em sua estrutura molecular um anel beta-lactâmico diferindo entre si nas cadeias laterais (BAPTISTA, 2013).

De acordo com Pupo et al. (2006), pela natureza mais complexa da parede celular de bactérias Gram-negativas, os antimicrobianos beta-lactâmicos são pouco capazes de atravessar a barreira lipídica da célula bacteriana. Antes mesmo da penicilina, primeiro antibiótico beta-lactâmico a ser lançado comercialmente, houve o surgimento da resistência bacteriana através de enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico do antimicrobiano, essencial para a eficácia do fármaco, a primeira beta-lactamase a ser identificada foi em *E. coli* (ABRAHAM; CHAIN, 1940). As cefalosporinas de terceira e quarta geração, quinolonas e aminoglicosídeos são considerados agentes antimicrobianos com importância crítica para *E. coli*, onde a resistência

pode comprometer a eficácia destes agentes que são comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas (HAMMERU; HEUER, 2009).

Segundo Bradford (2001), a rápida resistência a beta-lactâmicos principalmente em *Staphylococcus aureus*, é devido a uma penicilinase mediada por plasmídeos que se espalhou rapidamente em outras espécies bacterianas. A primeira beta-lactamase mediada por plasmídeo encontrada em bactérias Gram-negativas foi a TEM-1, descrita no início dos anos 1960, de uma cepa de *E. coli* isolada em uma cultura sanguínea de uma paciente chamada Temoniera na Grécia, e por ser mediada por plasmídeos e transposons é de fácil propagação para outras espécies bacterianas.

A produção de enzimas beta-lactamases que são capazes de promover a hidrólise do anel beta-lactâmico é o principal mecanismo de resistência de Gram-negativas a esses antimicrobianos. A resistência as cefalosporinas de terceira geração é geralmente devido à produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e mediadas por plasmídeos ou integrons (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010). Por estarem localizados em plasmídeos, os genes ESBLs podem facilmente ser transferidos dentro e entre espécies bacterianas (XU et al., 2011). Alguns genes são mutantes de beta-lactamases mediadas por plasmídeos estabelecidos, como o *bla*TEM e *bla*SHV e outros são mobilizados a partir de bactérias do ambiente como o *bla*CTX-M (OVERDEVEST et al., 2011).

Tem sido observado que em cepas que transportam ESBLs dos tipos CTX-M-14 e CTXM-15, também possuem susceptibilidade diferenciada para outros antimicrobianos, como fluoroquinolonas e amoxicilina associada ao ácido clavulânico, sendo um fato importante, pois ambos os fármacos são alternativas no tratamento de infecções causadas por cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs (BAJAJ, 2016).

### **1.2.2 ESBLs**

As ESBLs são enzimas que hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico dos antibióticos e conferem resistência a cefalosporinas (como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime) e a monobactâmicos (como aztreonam). Ocorrem predominantemente em espécies de *Klebsiella* e *E. coli*, mas também podem estar presentes em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (VERCAUTEREN et al., 1995).

As ESBLs “clássicas” são enzimas transmitidas/codificadas por plasmídeos, como as famílias: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e Oxacilina (OXA). Dentro destas maiores “famílias”, estão incluídas as duas primeiras variantes de beta-lactamases identificadas (SIROT et al., 1987; SOUGAKOFF et al., 1988). Embora estas variantes mantenham-se atualmente como as mais isoladas, nos últimos anos houve uma explosão no desenvolvimento/aparecimento de outras ESBLs (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES). Como resultado disso, mais de 370 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente (STÜRENBURB et al., 2005). Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de beta-lactamases denominadas “Serine-Beta-Lactamases” que, juntamente com as “Metallo-Beta-Lactamases”, formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar antibióticos beta-lactâmicos (SHAH et al., 2004).

A relação fundamental entre as enzimas ESBLs foi melhor refletida pelo esquema de classificação de Ambler, que é baseada na similaridade entre as sequências de aminoácidos (AMBLER et al., 1991). Outro esquema de classificação utilizado é o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH; CALMON; JOHNSON, 1995; BUSH, JACOBY 2010). A classificação molecular das beta-lactamases é baseada na sequência de nucleotídeos e aminoácidos destas enzimas. Nos dias atuais, quatro classes são conhecidas (A a D), e são correlacionadas com suas classificações funcionais. As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas “Serinas”, enquanto a classe B ou Metallo-beta-lactamases necessitam de Zinco (Zn) para sua ação. A maioria das ESBLs estão contidas na classe molecular “A” de Ambler (AMBLER, 1980), caracterizadas pela presença do sítio ativo “Serina” e massa molecular de aproximadamente 29.000 KDa, e preferência (afinidade) de hidrólise sobre as penicilinas (HALL; BARLOW, 2005).

As ESBLs diferem-se entre si (mesma família) por substituições na sequência de aminoácidos (de 1 a 7), os quais alteram configurações e propriedades do seu sítio ativo. As substituições mais importantes são as mutações que conferem amplo espectro a estas enzimas (Ex.: Posição 164 de Ambler nas TEMs, 179 nas SHVs e 238 em ambas), que ampliam seu sítio ativo, o qual produz espaço suficiente para interação entre a enzima e os antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro portadores de grandes cadeias oxiamino. Como resultado, esta modificação faz com que estas enzimas sejam capazes de hidrolisar antibióticos beta-lactâmicos como a: Cefotaxima, Cefuroxima e Aztreonam. Em contraste como suas “parentes”

próximas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), que reconhecem os antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro como substrato muito fracamente (KNOX, 1995).

Apesar de terem sido descritas no início dos anos 80, somente no final da década de 90 e início do ano 2000 estas enzimas passaram a representar um problema clínico significativo. Vários relatos de falha terapêutica associados ao uso de cefalosporinas de amplo espectro no tratamento das infecções causadas por enterobactérias produtoras dessas enzimas foram publicados (PATERSON et al., 2001). Por outro lado, também foram publicados relatos de sucesso clínico com o uso dessas cefalosporinas no tratamento de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBLs (BIN et al., 2006).

A disseminação global, o rápido aumento da incidência e o aumento da mortalidade das infecções por *E. coli* resistentes à cefalosporinas de espectro estendido na última década tornaram-na uma das maiores ameaças para a saúde humana no mundo e descobrir as origens desta mudança pode revelar novos alvos para a intervenção de saúde pública. Através de evidências que algumas infecções extra-intestinais de *E. coli* humanas originam-se de produtos de origem animal, onde aves parecem ser a fonte mais provável, conclui-se que a transmissão ocorre provavelmente através de elementos genéticos móveis de cepas de aves para cepas de humanos, mas os parâmetros específicos continuam não elucidados, sendo importante a pesquisa de amostras em caráter mais amplo, possibilitando assim, comparações de mecanismos de transmissão que podem oferecer risco a saúde pública (LAZARUS et al, 2015).

Em um estudo sobre resistência em carcaças de frango, Koga et al., (2015) notaram o aumento da resistência encontrada em cepas isoladas nos anos de 2007 e 2013. Neste intervalo, a múltipla resistência subiu 5,5%, e todas as cepas testadas em 2013 foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, fato que não ocorreu em 2007. Outro fato interessante deste estudo realizado no estado do Paraná é a prevalência do gene CTX-M (alelo codificante das enzimas do grupo cefotaxima 2), que foi encontrado em 64,1% das amostras.

Um estudo recente destaca ainda que cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs tem uma maior habilidade de formar biofilmes, havendo também uma maior taxa de resistência antimicrobiana pelos biofilmes produzidos a quase todos os antimicrobianos testados (NEPAUNE et al., 2016).

### 1.3 BIOFILMES

O termo biofilme foi utilizado por Bill Costerton pela primeira vez em 1978, para descrever uma estrutura heterogênea que compreendia diferentes populações de microrganismos unidos por uma matriz. Isso aconteceu quando tornou-se claro que os biofilmes constituem uma fase de crescimento profundamente distinta da fase de crescimento planctônico estudada tão assiduamente 15 décadas após as descobertas de Louis Pasteur quanto ao crescimento microbiano (CONSTERTON et al., 1995). Grande parte dos estudos obtidos até hoje advém da compreensão de culturas puras. No entanto, na natureza, as bactérias quase sempre existem em comunidades complexas, agindo como presas ou predadoras, podendo ser comensais, mutualistas ou patogênicas quando vivem em conjunto (SACHS; HOLLOWELL, 2012).

O ciclo de vida das bactérias pode ser dividido em duas fases da vida. A primeira, unicelular, em que as células bacterianas vivem de forma planctônica, ou seja, livres, e a segunda fase, quando multicelulares, na forma de biofilme ou sésil, vivendo em comunidades (BERLANGA; GUERRERO, 2016). Uma alternativa entre as duas fases requer a transição das células no formato de vida planctônico para o início da formação de um biofilme, ou de uma célula em biofilme para o estado planctônico (CONSTERTON et al., 1995).

O primeiro passo para a formação de um biofilme é a adesão de bactérias planctônicas à uma superfície, fato que ocorre aleatoriamente. Esta primeira adesão é reversível e mantida por interações físico-químicas não específicas constituindo o alicerce para o crescimento do biofilme (RABIN et al., 2015). A segunda fase de adesão consiste na transformação da primeira etapa que é reversível para um estado irreversível, onde as bactérias passam a secretar substâncias com capacidade de adesão que envolvem o biofilme (STOODLEY et al., 2002). É nesta fase que se desenvolvem microcolônias e há a maturação do biofilme, que agora assemelha-se a uma comunidade envolta por diversas substâncias e rodeada de poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos (KUMAR et al., 2017). A última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção, e consiste no deslocamento do biofilme maduro em forma de agregados celulares ou de células livres. Quando em vida livre, estes agregados ou até mesmo as células livres tem a capacidade de colonizar novos ambientes e formar novos biofilmes (STOODLEY et al., 2002; KUMAR et al., 2017).

Quando se compara a fase reversível e a irreversível, esta última é capaz de tolerar forças químicas e físicas mais fortes. Na ligação inicial desta fase, os flagelos e a mobilidade mediada pela pili tipo IV são importantes, uma vez que os flagelos são essenciais para a ligação entre as células e a superfície. A mobilidade mediada pela pili tipo IV confere à célula a capacidade de agregar-se e formar microcolônias (RABIN et al., 2015). A capacidade de ligação destes biofilmes é muito importante, uma vez que servem para proteger os microrganismos de ambientes hostis. Na prática, isso geralmente está ligado ao embate entre a sobrevivência dos microrganismos contra desinfetantes, antibióticos ou a ação de biocidas, o que está diretamente ligado ao problema que estes sistemas causam quando presentes na forma de contaminantes na indústria de alimentos, que além de causar problemas com a limpeza e higiene, levam à perda de energia, entupimento de canos, entre outros problemas (MATILLA-SANDHOLM; WIRTANEN, 2012).

### **1.3.1 Risco dos biofilmes à indústria**

Com altos níveis de nutrientes e uma ampla área superficial atrativa aos microrganismos, os sistemas aquáticos industriais predispõem à formação de biofilmes. As populações aderem-se aos sistemas industriais principalmente na conexão de filtros e faces de injeção, formando incrustações com capacidade de produção de metabólitos nocivos, como por exemplos  $H_2S$  (CONSTERTON et al., 1987).

Além da corrosão, o biofilme também leva à riscos de contaminação microbiana pela liberação de agentes patogênicos de torres de resfriamento ou pelo comprometimento da qualidade da água nos sistemas de distribuição de água potável (MATILLA-SANDHOLM; WIRTANEN, 2012). Um exemplo de bactéria formadora de biofilme que pode causar doenças é a *Salmonella* Heidelberg. Em um estudo realizado por Rodrigues et al., (2009), foi verificado que esta bactéria isolada de um abatedouro avícola tinha a capacidade de formar biofilme sem a presença de glicose. Este estudo ressalta os perigos que são os contaminantes desprendidos por biofilmes, uma vez que os isolados foram coletados após o *chiller*, um dos pontos em um abatedouro avícola que representa maior perigo, devido a dificuldade de higienização (RODRIGUES et al., 2009).

Além de *Salmonella* spp., outras bactérias têm capacidade de formar biofilmes e se desprenderem destes com risco à saúde humana, sendo uma delas a *E. coli*, que pode aderir e

formar biofilmes em superfícies comumente usadas em ambientes de processamento de alimentos. Este microrganismo pode formar biofilmes em condições de nutrientes e fatores ambientais diversos, sendo que estudos já comprovam que sua remoção de plantas de processamento de carnes é dificultada, podendo permanecer como contaminante por longos períodos (DEWANTI; WONG, 1995).

O processo de limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos de produtos e indiretamente este é também o primeiro ponto crítico na remoção, morte e controle de biofilmes, uma vez que a remoção incompleta deste facilita a readesão das bactérias a superfície e a formação de um novo biofilme, mesmo que as bactérias do biofilme anterior tenham sido mortas (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010). Assim a principal estratégia de controle deve ser a limpeza regular, de forma a prevenir a formação de biofilmes.

Como a limpeza permite apenas a remoção de aproximadamente 90% das bactérias da superfície e não as elimina, a desinfecção é indispensável para eliminar os microrganismos (SREY; JAHID; HA, 2013). Os agentes antimicrobianos usados no processo de desinfecção devem matar os microrganismos para que a população de superfície seja reduzida (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010). Outro ponto crítico na limpeza e desinfecção é a presença de material orgânico, como gordura, carboidratos e materiais a base de proteínas. Além desses, fatores como pH, temperatura, dureza da água, presença de inibidores químicos, concentração e tempo de contato também são fatores que influenciam a eficácia dos desinfetantes (SREY; JAHID; HA, 2013).

A forma de funcionamento de células individuais é totalmente diferente daquela em que vivem os biofilmes no mesmo ecossistema. Então devemos aceitar que as bactérias respondem às mudanças em seu ambiente por profundas variações fenotípicas na atividade enzimática, composição da parede celular e estrutura de superfície (CLOETE, 2003). Essas alterações fenotípicas envolvem também moléculas alvo para biocidas, antibióticos, anticorpos e fagócitos, envolvendo estruturas externas que controlam o acesso desses agentes aos alvos. Portanto, devemos esperar que as bactérias do biofilme mostrem algumas alterações na susceptibilidade a estes agentes antibacterianos (CONSTERTON et al., 1987).

As substâncias antibacterianas visam uma variedade de locais celulares, desde a membrana citoplasmática a funções respiratórias, enzimas e o material genético, sendo que quando usados em baixas concentrações, os produtos bactericidas agem como bacteriosostáticos.

Com isso, as possíveis explicações para o aumento de resistência das bactérias quando em biofilmes incluem a limitada difusão do antimicrobiano pela matrix do biofilme, interação dos antimicrobianos com a matrix do biofilme, resistência mediada por enzimas, o nível de atividade metabólica no biofilme, adaptação genética, bombas de efluxo e ainda a estrutura da membrana (CLOETE, 2003).

Por muitas vezes conter bactérias patogênicas com mecanismos de resistência, os biofilmes apresentam um risco para a saúde pública e comprometem a qualidade dos alimentos e produtos não alimentares, pois há uma dificuldade no tratamento de infecções causadas por bactérias formadoras de biofilmes, especialmente no trato urinário e no tecido periodontal. Nestes casos, o tratamento dessas infecções é dificultado pela resistência antimicrobiana, podendo esta ser de 100 a 1000 vezes maior do que das células planctônicas (BERLANGA; GUERRERO, 2016).

Um grande revés no tratamento de infecções relacionadas ao biofilme é a ineficácia dos antimicrobianos existentes, devido às camadas protetoras constituídas pelas células no biofilme, fazendo com que a penetração do antibiótico seja limitada (RABIN et al., 2015). Outro impedimento de uma ação eficaz é que o efeito de muitos antimicrobianos é baseado na inibição da atividade de crescimento, porém a maioria das bactérias nos biofilmes não está mais crescendo ativamente e sua resistência é, portanto, alta (CONSTERTON, 1987). Com isso, deve-se evitar a formação dos biofilmes nas indústrias, criando programas de limpeza e desinfecção que previnam e/ou erradiquem os biofilmes, incluindo os materiais de contato com alimentos como elemento no projeto higiênico de alimentos, identificando quais são as áreas mais propensas a formação de biofilmes e ainda, investindo na pesquisa sobre a eficácia dos agentes de limpeza e desinfetantes utilizados (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

Para que a limpeza e desinfecção sejam eficientes, a adoção de planos como as boas práticas de fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPC/HACCP) são importantes, além é claro, de processos como o *Clean-in-place* (CIP), que inclui a limpeza da planta sem desmontar ou abrir equipamentos com ciclos alternados de soluções detergentes e desinfetantes a fim de deslocar as células aderidas e impedir a readesão (ARAÚJO et al., 2011).

### 1.3.2 Genes de adesinas e biofilme

A ligação das bactérias patogênicas às superfícies mucosas é um passo crítico na patogênese de sua infecção, sendo as adesinas responsáveis pela adesão específica às células do tecido hospedeiro. A especificidade do hospedeiro e o tropismo do tecido são características exibidas por bactérias diferentes e são determinadas em parte pela interação entre as adesinas e seus receptores complementares nas superfícies das células hospedeiras caracterizando assim, a capacidade de virulência destes microrganismos (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Já na formação dos biofilmes, as adesinas podem ser responsáveis pela aderência bacteriana às superfícies, pelo desenvolvimento da arquitetura do biofilme e diferenciação de microcolônias dentro da matriz polissacarídica, que resulta no biofilme maduro (CONSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

A análise transcriptômica de genes expressos em vários estágios da formação de biofilme não fornece uma via de consenso devido à imensa diversidade fisiológica e de espécies que o abrigam. O fator consistente na regulação dos biofilmes é *c-diGMP* que ajuda na agregação de células e uma diminuição no seu nível provoca a dispersão de células de biofilmes (KUMAR et al., 2017)

Em *E. coli* as fímbrias do tipo 1, bem como a motilidade mediada por flagelos, contribuem para os estágios iniciais de ligação do biofilme em superfícies abióticas, sendo a expressão do gene *LrhA* com efeito sobre a expressão de flagelos e de fímbrias do tipo 1 (BLUMER et al., 2005).

A motilidade mediada por flagelos ajuda as células bacterianas a superar as forças repulsivas presentes entre o meio de crescimento e a superfície abiótica, proporcionando energia cinética para superar essas forças, permitindo assim, o estabelecimento de interações estáveis com a superfície, fato que não ocorre na ausência de motilidade, onde a adesão a superfície é dramaticamente diminuída e como consequência, o tempo de formação do biofilme aumenta de forma correspondente. Quando a mutação *ompR* aumenta a produção da adesina “*crl*” ou ondulada aumenta também a probabilidade de interações produtivas entre a bactéria *E. coli* e as superfícies abióticas (DANESE et al., 2000).

As adesinas fimbriais podem ser distinguidas pela especificidade do receptor, sendo que as fímbrias do tipo 1 ligam-se a receptores que contém manose e são expressas por cepas de *E. coli* patogênicas e não patogênicas. Já as fímbrias P, que são predominantemente encontradas em

estirpes uropatogênicas, são capazes de reconhecer as porções de glicolídeos  $\alpha$ -D-Gal-(1-4)-p-D-Gal localizadas em diferentes células. Além dessas, as adesinas fimbriais S (*sfa*) facilitam a ligação de bactérias a receptores resíduos de ácido-(2-3)-p-Gal  $\alpha$ -siálico (SCHMOLL et al., 1990).

O estudo e detecção da fonte de desenvolvimento dos biofilmes são essenciais, uma vez que a adesão dessas células pode influenciar no processo de colonização das superfícies abióticas, sendo que quando esta capacidade é determinada, pode-se influenciar e até mesmo reduzir algumas rotas de transmissão deste agente contaminante ao longo da cadeia alimentar (COOKSON; COOLEY; WOODWARD, 2002).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral:

Caracterizar a patogenicidade, a resistência antimicrobiana e a produção de biofilmes em isolados de *E. coli* provenientes de cortes de carne de frango comercializados no município de Chapecó – SC.

### 1.4.2 Objetivos específicos:

- Determinar e comparar o percentual de isolamento da bactéria *E. coli* em cortes de carne de frango de diferentes marcas comercializadas embaladas no município de Chapecó – SC;
- Pesquisar o perfil de resistência e multirresistência nas cepas isoladas;
- Pesquisar a produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido nas cepas isoladas através do teste de disco-aproximação;
- Pesquisar a presença de genes de beta-lactamases de espectro estendido nas amostras positivas ao teste de disco-aproximação;
- Pesquisar e quantificar a produção de biofilme nas cepas isoladas;
- Pesquisar a presença de genes referente as adesinas envolvidas na produção de biofilmes nas cepas que foram classificadas como fortemente produtoras de biofilmes.

## 2. MANUSCRITO OU ARTIGO I

### **Caracterização Genotípica de Patogenicidade e Resistência Antimicrobiana de Isolados de *Escherichia coli* Provenientes de Carne de Frango**

Regiane B. Crecencio<sup>a</sup>, Maiara C. Brisola<sup>a</sup>, Lenita M. Stefani<sup>a</sup>, Dinael Birner<sup>a</sup>, Angélica Frigo<sup>a</sup>, Luana Rampazzo<sup>a</sup>, Karen A. Borges<sup>b</sup>, Thales Q. Furian<sup>b</sup>, Carlos Tadeu Pippi Salle<sup>b</sup>, Hamilton Luiz de Souza Moraes<sup>b</sup>, Glaucia Amorim<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Santa Catarina, Chapecó, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>c</sup> Universidade do Estado de São Paulo, Ilha Solteira, Brasil

De acordo com normas para publicação em:

International Journal of Food Microbiology

**Caracterização genotípica de patogenicidade e resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de carne de frango**

Regiane B. Crecencio<sup>a</sup>, Maiara C. Brisola<sup>a</sup>, Lenita M. Stefani<sup>a</sup>, Dinael Bitner<sup>a</sup>, Angélica Frigo<sup>a</sup>, Luana Rampazzo<sup>a</sup>, Karen A. Borges<sup>b</sup>, Thales Q. Furian<sup>b</sup>, Carlos Tadeu Pippi Salle<sup>b</sup>, Hamilton Luiz de Souza Moraes<sup>b</sup>, Glaucia Amorim<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC-Oeste), Chapecó, SC, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade do Estado de São Paulo (USP), Ilha Solteira, SP, Brasil.

Resumo – Objetivou-se caracterizar a patogenicidade, resistência antimicrobiana e o perfil de produção de biofilmes em isolados de *E. coli* provenientes de cortes de carne de frango *in natura*. Para isso, 150 amostras oriundas das principais empresas avícolas do Brasil foram coletadas. Procedeu-se o isolamento de cepas de *E. coli*, seguido do antibiograma com os antimicrobianos: amoxicilina associado ao ácido clavulânico, ceftiofur, enrofloxacin, gentamicina, trimetoprima + sulfametoxazol, além do teste de disco aproximação e da avaliação da capacidade de formação de biofilmes em microplacas de poliestireno para todas as cepas isoladas. Avaliou-se ainda a presença de genes de ESBLs nas amostras positivas para o teste de disco aproximação (*bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC*), e de genes de adesinas relacionados à patogenicidade e formação de biofilme (*sfa/foc*, *afa/draB*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *tsh*, *papC*, *mat*, *crl*, *felA*, *fimH* e *papG*) nas cepas classificadas como fortemente formadoras de biofilme. Encontrou-se um percentual de isolamento de 58,66%, sendo que a marca A apresentou maior percentual (70%) de isolados positivos para *E. coli*, seguidas das marcas D, B e C com 60, 53,3 e 50% respectivamente. O maior perfil de resistência observado foi para a classe dos beta-lactâmicos com 39,5% de resistência, seguido da sulfonamida (36,9%) e das polimixinas (33,4%). Dos isolados obtidos, 77% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. A marca A apresentou o maior percentual geral de resistência com 95,23%, seguida pela marca C (80%), B (75%) e D (69,44%), sendo que 36,3% destes foram multirresistentes. Ainda, 17,04% das cepas de *E. coli* foram identificadas como produtoras de ESBLs e 70,44% eram de moderada a fortemente formadoras de biofilme. O gene *bla*TEM-1 foi o mais prevalente (73,33%), seguido dos genes *bla*SHV-1 (46,66%), e *bla*CMY-2 (6%). Das 31 amostras fortemente formadoras de

biofilme, 26 (83,87%), 24 (77,41%) e 20 (64,51%) apresentaram os genes *fimC*, *papG* e *crl*, respectivamente. Os dados obtidos neste trabalho demonstram que as cepas de *E. coli* isoladas possuem um perfil de resistência e patogenicidade importantes, uma vez que além de serem produtoras de beta-lactamases de espectro estendido são também produtoras de biofilmes, servindo como contaminantes e multiplicadores de resistência aos alimentos processados. Destaca-se a presença do gene *afa/dra* que no conhecimento dos autores foi detectado pela primeira vez em carnes brasileiras.

### Highlights

- 58,66% das amostras foram positivas para *E. coli*.
- 36,34% dos isolados foram multirresistentes.
- 17,04% das cepas foram produtoras de ESBLs e destas, 73,33% continham o gene *bla*TEM-1.
- 35% das cepas foram fortemente formadoras de biofilme (FTFB).
- As cepas FTFB foram positivas para pelo menos um gene de adesina.
- O gene *afa/dra* foi detectado em carne de frango brasileira pela primeira vez.

Keywords – *afa/dra*, Biofilme, ESBLs, *Escherichia coli*.

## 1. Introdução

Com um consumo *per capita* de 43,25 kg/hab/ano e a crescente demanda da carne de frango, o Brasil destaca-se como o maior exportador mundial deste produto (ABPA, 2017). Classificada como alimento saudável, a carne de frango *in natura* serve como excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, como por exemplo a bactéria *Escherichia coli* (Souza et al., 2016).

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* serem consideradas bactérias comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, as cepas patogênicas podem causar diferentes infecções intestinais e extraintestinais por serem facilmente encontradas no meio ambiente e em alimentos (Shin et al., 2015). As cepas de *E. coli* de origem aviária e as oriundas de infecções extraintestinais em humanos podem apresentar perfil de virulência semelhante, não podendo ser distintas filogeneticamente e em ensaios *in vivo*, reforçando o potencial zoonótico destas (Cunha et al., 2013).

Este fato é preocupante uma vez que cepas zoonóticas carregam também genes de resistência antimicrobiana. Em um estudo realizado na Noruega, sugeriu-se que houve a transferência de genes de resistência às cefalosporinas da carne de frango para humanos, gerando dificuldades no tratamento de pessoas, sendo estas cepas de *E. coli* fonte de plasmídeos de resistência à patógenos oportunistas na microbiota humana (Berg et al., 2017).

Além da preocupação com a resistência antimicrobiana, a produção de biofilmes em carnes processadas em plantas industriais é também uma realidade, uma vez que estudos já comprovam que a remoção destes microrganismos em plantas de processamento de carnes é dificultada (Dewanti and Wong, 1995). Além de permanecer por longos períodos, os biofilmes podem também ser fonte de resistência antimicrobiana, uma vez que a transferência de genes de resistência é facilitada e a matriz protetora potencializa esse efeito (Berlanga and Guerrero, 2016). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar genotipicamente a patogenicidade, o perfil de resistência antimicrobiana e a capacidade de produzir biofilme em isolados de *E. coli* provenientes de cortes de carne de frango *in natura* comercializados no município de Chapecó, localizado no estado de Santa Catarina (SC), no período de fevereiro de 2016 a agosto de 2017.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Isolamento de *E. coli* em cortes de carne de frango

Foram coletadas 150 amostras de cortes de carne de frango congelados comercializados *in natura*, embaladas pelas principais agroindústrias brasileiras e coletadas nas redes de supermercados da cidade de Chapecó – SC, no período de fevereiro de 2016 a agosto de 2017, por conveniência, tendo como origem os estados do Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As agroindústrias foram identificadas em A, B e C, e a identificação D corresponde a um *pool* de marcas menores. Foram coletadas 30 amostras das marcas A, B e C e 60 amostras das marcas menores com a identificação D.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), em Chapecó-SC. Para isolamento de possíveis cepas de *E. coli* nas amostras de cortes de carne de frango, a metodologia descrita por DOWNES; ITO (2001), com adaptações para a rotina do LABMIM foi utilizada. Os produtos cárneos obtidos nos supermercados foram adquiridos e mantidos em caixas térmicas até a chegada no laboratório, onde foram deixados sobre bancada estéril até atingir a temperatura ambiente afim de promover o descongelamento, e posteriormente, 25 g de cada amostra foram colocados de forma asséptica em sacos de polietileno esterilizados, com a adição de 225 mL de água peptonada a 1% esterilizada, homogeneizando-se durante um minuto, seguido de incubação a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas em estufa microbiológica. Posteriormente, uma alíquota foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB LEVINE – KASVI-K25-610019) e Ágar MacConkey (KASVI – K25-610028) e estas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas em estufa microbiológica.

Com uma agulha de platina, uma colônia que possuía características de *E. coli* (colônias verdes metálicas no ágar EMB e rosas devido a fermentação da lactose no ágar MacConkey) de cada amostra foi submetida a testes bioquímicos em: Ureia Ágar Base, Ágar TSI, Ágar SIM Medium e Ágar Simmons Citrate e posteriormente incubados a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas. Após a confirmação bioquímica das colônias, as mesmas foram inoculadas e incubadas em microtubos contendo meio TSA (Tryptone Soya Ágar) a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas com posterior adição de glicerina e armazenamento a -20 °C.

## 2.2 Teste de disco-difusão

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a metodologia aprovada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que consta na IN M-2 A-8 de Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão (ANVISA, 2003). Foram testadas cinco classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos como penicilina (amoxicilina associado ao ácido clavulânico - 20/10 µg) e cefalosporina de terceira geração (ceftiofur – 30 µg), fluoroquinolona (enrofloxacina – 5 µg), aminoglicosídeo (gentamicina – 10 µg), sulfonamida (trimetoprima + sulfametoxazol - 1,25/23,75 µg) e polimixinas (colistina – 30 µg). Após incubação por 24 horas a  $\pm 37^\circ \text{C}$  em estufa microbiológica, a presença dos halos de inibição foi analisada e medida, classificando-se os isolados de *Escherichia coli* em sensíveis ou resistentes, sendo que as amostras que apresentaram perfil intermediário foram consideradas sensíveis (ANVISA, 2003; CLSI, 2015). Como controle positivo utilizou-se uma cepa de *Salmonella* Heidelberg sabidamente produtora de ESBLs.

## 2.3 Teste de disco-aproximação

Para detecção das enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi utilizada a técnica de disco aproximação descrita no estudo de Lezameta and Gonzáles-Escalante and Tamariz (2010), adaptada. Uma colônia da bactéria *E. coli* foi inoculada em um tubo contendo 3 mL de caldo lactosado e incubada a  $37^\circ \text{C} \pm 1$  durante 8 horas ou até ter turbidez semelhante ao tudo da escala 0,5 de MacFarland. Após, utilizando-se um suabe estéril umedecido na suspensão bacteriana, a amostra foi semeada de forma suave em todas as direções da placa contendo ágar Muller-Hinton (Kasvi), e com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, os discos contendo cada antimicrobiano foram colocados em uma distância de 25 mm entre eles. Os discos utilizados para este teste foram: amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) (20/10 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), ceftazidima (CAZ) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), cefepime (CPM) (30 µg). Posteriormente foram incubados em estufa bacteriológica a  $37^\circ \text{C} \pm 1$  por 18 a 24 horas. Foi utilizada uma amostra de *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 como referência. Após incubação, as placas foram submetidas à leitura do teste, sendo que a presença de enzimas beta-lactamases de espectro estendido

(ESBLs) foi verificada pela presença da “zona fantasma”, representada pela inibição sinérgica entre os discos utilizados ao redor do disco central.

#### *2.4 Resistência a Múltiplas Drogas (MDR)*

A partir dos resultados obtidos no teste de disco-difusão, determinou-se o número de isolados que foram considerados multirresistentes, isto é, resistentes a três ou mais antimicrobianos de diferentes classes, onde não foram consideradas as cepas com padrão intermediário (Frye and Fedorka-Cray, 2007).

#### *2.5 Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA)*

O Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) para cada amostra foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Krumperman (1983). O IRMA revela a relação entre o número de antimicrobianos resistentes e o número total de classes testadas.

#### *2.6 Teste de Formação de Biofilme*

O teste de formação de biofilmes foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Stepanović et al. (2000). As cepas de *E. coli* foram incubadas em caldo TSB (Soja Trypticaseína - Kasvi) sem glicose a  $37 \pm 1$  °C por 24 h e destas, alíquotas foram diluídas em um novo tubo até atingir a concentração semelhante ao tudo<sub>1</sub> da escala de MacFarland. Após isso, foram inoculados 200 µL de cada suspensão em triplicata em microplaca de poliestireno de 96 poços estéreis, sendo que nos primeiros três poços foi adicionado somente caldo estéril como controle negativo. A placa foi incubada em estufa microbiológica sem circulação de ar a  $37 \pm 1$  °C por 24 h.

Após esse período, a suspensão bacteriana foi aspirada de cada poço e lavada por três vezes com 250 µL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril, secando levemente a placa. As células bacterianas foram então fixadas com 200 µL de metanol P.A. por 15 minutos e secas em temperatura ambiente. Em seguida, foram coradas com 200 µL de cristal violeta de Hucker 2% durante 5 minutos. Decorrido este tempo as placas foram lavadas em água corrente e secas em

temperatura ambiente. A ressolubilização das amostras foi realizada com 160  $\mu$ L de ácido acético glacial a 33% e a leitura realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific® Multiskan GO) a 570nm.

Após a leitura o valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtido pela média aritmética da absorbância dos três poços e este valor comparado com três desvios padrões acima da média da absorbância dos controles negativos (Docn). Assim, as cepas foram classificadas em:

$Doa \leq Docn$	Não formadora de biofilme;
$Docn < Doa \leq 2 \cdot Docn$	Fracamente formadora de biofilme;
$2 \cdot Docn < Doa \leq 4 \cdot Docn$	Moderadamente formadora de biofilme;
$4 \cdot Docn < Doa$	Fortemente formadora de biofilme.

### 2.7 Pesquisa de Genes de Resistência Relacionados a ESBLs

Foi utilizado o kit PureLink® Genomic DNA For Purification of Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad) para a extração do DNA genômico dos isolados de *E. coli* positivos para ESBLs no teste de disco-aproximação.

A detecção dos genes de resistência relacionados aos antimicrobianos beta-lactâmicos (*bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC*) foi realizada através da metodologia de PCR convencional. As reações foram realizadas conforme indicado pelo Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA). As condições para amplificação dos genes *bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 foram obtidas de acordo com Chen et al. (2004) e as condições para amplificação do gene *AmpC* foram executadas de acordo com Alcaine et al. (2005) (Tabela 1). Foram utilizados dois tipos de controle para as análises, sendo que o controle negativo da reação de amplificação constituiu-se em uma amostra contendo os reagentes da reação, porém sem adição de DNA extraído (para detectar uma possível ocorrência de amplificação de material genético inespecífico); e o controle positivo da reação de amplificação constituiu-se do gene *invA* com uma amostra de *Salmonella* Heidelberg.

**Tabela 1** – Primers dos genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, condições para amplificação, pares de bases (Pb) e referências.

Gene	Sequência Nucleotídeos (5'-3')	Condições de Amplificação	Ciclos	pb	Referências
<i>bla</i> CMY-2	(F) TGG CCG TTG CCG TTA TCT AC (R) CCC GTT TTA TGC ACC CAT GA	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	870	Chen et al. 2004
	<i>bla</i> SHV-1	(F) GGC CGC GTA GGC ATG ATA GA (R) CCC GGC GAT TTG CTG ATT TC	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	714
<i>bla</i> TEM-1		(F) CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA (R) ACT CCC CGT CGT GTA GAT AA	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	643
	<i>bla</i> CTX-M2	(F) GGC GTT GCG CTG ATT AAC AC (R) TTG CCC TTA AGC CAC GTC AC	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	486
<i>bla</i> OXA-1		(F) AAT GGC ACC AGA TTC AAC TT (R) CTT GGC TTT TAT GCT TGA TG	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	595
	<i>bla</i> PSE-1	(F) TGC TTC GCA ACT ATG ACT AC (R) AGC CTG TGT TTG AGC TAG AT	95°C-10 min; 95°C-30 s; 55°C- 1 min; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	30	438
<i>Amp</i> C		(F) AAC ACA CTG ATT GCG TCT GAC (R) CTG GGC CTC ATC GTC AGT TA	95°C-9,5 min; 95°C-45 s; 59°C- 45 s; 72°C-1 min; 72°C- 7 min	40	1226

## *2.8 Pesquisa de genes de adesinas relacionados a produção de biofilme*

Todas as amostras classificadas como fortemente formadoras de biofilme foram submetidas a extração de DNA para a execução da pesquisa de genes de adesinas relacionados a patogenicidade e a formação de biofilme.

A extração do DNA para a execução dos testes moleculares foi realizada através do método por calor, adaptada a partir da técnica descrita por Borsoi et al. (2009). Uma alíquota de 50 µL de cada uma das amostras armazenadas em BHI com glicerol foi reativada em caldo BHI, o qual foi incubado a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Posteriormente, o caldo cultivado foi semeado por esgotamento em ágar EMB. As placas foram novamente incubadas, conforme as condições anteriormente descritas. Entre três a cinco colônias bacterianas isoladas no ágar EMB foram coletadas com uma alça de platina estéril e solubilizadas em um microtubo contendo 200 µL de água ultrapura. Após, a solução foi resfriada a -20°C por 10 minutos e em seguida, aquecida a 100°C pelo mesmo período em banho-maria com agitação. Por último, a solução foi centrifugada a 14.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi repassado para um novo microtubo. O material foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

A reação de PCR convencional foi feita a partir do uso de Taq polimesase 0,4 µL, 2,5 µL tampão 10X, dNTPs a 10 mM, primers na concentração de 100 pmol, MgCl<sub>2</sub> a 4 mM, 5 µL do DNA da amostra e água qsp (quantidade suficiente para completar o volume final). Os genes foram analisados conforme Tabela 2.

## *2.9 Eletroforese*

Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo (marca Ludwig), com marcador do peso molecular de 1 pb (ProteoLadder) a 110 V, 150 mA, 110 W por 60 minutos em fonte Loccus LPS 300 HC. Após realizou-se a leitura em fotodocumentador com luz UV com sistema de fotodocumentação L-PIXEX.

## 2.10 Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio do teste Qui Quadrado ( $X^2$ ) e Teste Exato de Fisher. Ambos testes não paramétricos que consistem em analisar a associação entre as variáveis qualitativas. Para análise dos dados, utilizou-se o instrumento computacional do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) e o Software Excel.

**Tabela 2** – Primers dos genes relacionados as adesinas, condições para amplificação, pares de bases (Pb).

Gene	Sequência Nucleotídeos (5'-3')	Condições de Amplificação	Ciclos	Amplicon (pb)
<i>sfa/foc</i>	GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA CGGAGAACTGGGTGCATCTTA		25	1242
<i>afa/draB</i>	TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG CCAGTAACTGTCCGTGACA		25	810
<i>Iha</i>	TAGTGCGTTGGGTTATCGCTC AAGCCAGAGTGGTTATTCGC		25	608
<i>Hrla</i>	TCACTTGCAGACCAGCGTTTC GTAACACACTGCTGTACCT		25	540
<i>fimC</i>	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG CGTCATTTTGGGGTAAGTGC	Desnaturação inicial: 94°C por 3 min; desnaturação: 94°C por 30 seg; anelamento: 58°C por 30 seg; extensão: 68°C por 3 min; extensão final: 72°C por 10 min.	25	496
<i>Tsh</i>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC CTCCGATGTTCTGAACGT		25	824
<i>papC</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGCCATATTCACATAAC		25	508
<i>Mat</i>	TATACGCTGGACTGAGTCGTG CAGGTAGCGTCGAACTGTA		25	900
<i>Crl</i>	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC		25	270
<i>felA</i>	GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG GGCCCAGTAAAAGATAATTGAACC	Desnaturação inicial: 94°C por 5 min; desnaturação: 94°C por 1 min; anelamento: 63°C por 1 min; extensão: 72°C por 2 min; extensão final: 72°C por 10 min.	35	270
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	Desnaturação inicial: 95°C por 15 min; desnaturação: 94°C por 30 seg; anelamento: 63°C por 30 seg; extensão: 68°C por 3 min; extensão final: 68°C por 10 min.	25	1070
<i>papG</i>	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT		25	508

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Isolamento de *E. coli* em cortes de carne de frango

Das 150 amostras de carne de frango analisadas, 88 (58,66%) foram positivas para *E. coli*, sendo que a marca A teve um percentual de isolamento de 70% (21/30), a marca B de 53,3% (16/30), a marca C de 50% (15/30) e as marcas denominadas como D apresentaram 60% (36/60) de percentual de isolamento.

#### 3.2 Teste de disco-difusão

Em geral, as amostras apresentaram um maior perfil de resistência aos beta-lactâmicos, com 39,6% de prevalência, seguido das sulfonamidas com 36,96%. A classe de antimicrobiano que apresentou menor resistência foi das enrofloxacinas, com 14,96% (Tabela 3)

Através da análise pelos testes de Qui Quadrado ( $X^2$ ) e de Fisher podemos observar que houve significância ( $P < 0,05$ ) quando comparamos a resistência entre amoxicilina associada à ácido clavulânico com colistina, ceftiofur e enrofloxacina, com a colistina comparada ao ceftiofur, com a gentamicina comparada a sulfametazol associado ao trimetropim, quando comparados o ceftiofur com gentamicina e ainda observou-se diferença significativa quando comparado a enrofloxacina com gentamicina e sulfametazol associado ao trimetropim.

O percentual de resistência encontrado entre as marcas também foi diferente, como podemos observar na Tabela 3. A marca A teve uma maior porcentagem de resistência para as sulfonamidas, já a marca B para as polimixinas, a C para as cefalosporinas e a marca D teve maiores índices de resistência para as cefalosporinas e as sulfonamidas. Entre as marcas, o menor índice de resistência observado foi para a classe dos fluoroquinolonas. A resistência geral para a marca A foi maior, sendo que 95,23% das cepas isoladas desta marca foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. A segunda marca com maior resistência foi a C, com 80%. Quando comparamos as marcas com cada antimicrobiano testado, nenhum deles se mostrou significativo pelo teste de Qui Quadrado (Tabela 3).

**Tabela 3** – Percentual de resistência bacteriana encontrado por classe de antimicrobiano avaliado e resistência geral a pelo menos um antimicrobiano observada por marca\*

Marca	A	B	C	D	Resistência por ANTB	Chi-Quadrado
<b>Número de isolados</b>	21	16	15	36		
<b>AA</b>	(1) 4,7%	(2) 12,5%	(3) 20%	(7) 19,4%	(13) 11,4%	0,1597
<b>CEF</b>	(7) 33,3%	(3) 18,7%	(8) 53,3%	(14) 38,8%	(32) 28,1%	0,1969
<b>GEN</b>	(9) 42,8%	(8) 50%	(2) 13,3%	(11) 30,5%	(30) 26,4%	0,1219
<b>T+SU</b>	(15) 71,4%	(7) 43,7%	(5) 33,3%	(16) 44,4%	(42) 36,9%	0,3154
<b>ENR</b>	(4) 19%	(5) 31,2%	(1) 6,6%	(8) 22,2%	(17) 14,9%	0,5317
<b>COL</b>	(8) 38,1%	(9) 56,2%	(8) 53,3%	(12) 33,3%	(38) 33,4%	0,3387

\*ANTB: Antimicrobiano; BET: Beta-lactâmicos; AMI: Aminoglicosídeos; SUL: Sulfonamida; FLU: Fluorquinolona; POL: Polimixina; AA: Amoxicilina + ácido clavulânico; CEF: Ceftiofur; GEN: Gentamicina; T+SU: Trimetropim + sulfametazol; ENR: Enrofloxacina; COL: Colistina.

Das amostras isoladas, 73,86% foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Também pode-se observar que 3,4% das cepas foram resistentes a todas as cinco classes de antimicrobianos testadas, e que 22,7% foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados (Tabela 4).

**Tabela 4** – Sensibilidade antimicrobiana encontrada nas cepas estudadas

Sensibilidade antimicrobiana	Nº de amostras	Porcentagem (%)
Sensível a todos os antimicrobianos testados	20	22,72
Resistente a 1 antimicrobiano	20	22,72
Resistente a 2 antimicrobianos	16	18,18
Resistente a 3 antimicrobianos	19	21,59
Resistente a 4 antimicrobianos	7	7,95
Resistente a 5 antimicrobianos	3	3,40
Resistente aos 6 antimicrobianos	3	3,40
<b>Resistência geral</b>	<b>73,86</b>	

### 3.3 Teste de disco-aproximação

Das cepas estudadas (n=88), 15 (17,04%) foram positivas para a produção de ESBLs. Das amostras positivas, 40% (6/15) são da marca C, 26,66% (4/15) da marca A, 20% (3/15) da marca D e 13,33% (2/15) da marca B.

*3.4 Resistência a múltiplas drogas (MDR) e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA)*

O percentual de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e o cálculo do Índice de Resistência a Múltiplos Antimicrobianos (IRMA) podem ser observados na Tabela 5, onde, 32 cepas com padrão MDR positivo apresentaram IRMA acima de 0.5, indicando um alto potencial para a transferência horizontal de genes de resistência (Krumperman, 1983).

**Tabela 5** – Padrão MDR e IRMA encontrado nas amostras estudadas\*

<b>Padrão MDR</b>	<b>Identificação do Padrão</b>	<b>IRMA</b>	<b>Nº</b>	<b>Percentual (%)</b>
PEN-CEF-AMI-SUL-FLU-POL	A	1	3	9,375
PEN-CEF-AMI-SUL-POL	B	0,83	2	6,25
CEF-AMI-SUL-FLU-POL	C	0,83	1	3,125
PEN-CEF-AMI-FLU	D	0,66	1	3,125
CEF-AMI-SUL-POL	E	0,66	1	3,125
CEF-AMI-FLU-POL	F	0,66	1	3,125
CEF-AMI-SUL-FLU	G	0,66	1	3,125
AMI-SUL-FLU-POL	H	0,66	3	9,375
PEN-SUL-POL	I	0,5	1	3,125
PEN-CEF-SUL	J	0,5	1	3,125
PEN-CEF-POL	K	0,5	2	6,25
CTF-AMI-SUL	L	0,5	2	6,25
CEF-AMI-POL	M	0,5	2	6,25
CEF-SUL-FLU	N	0,5	2	6,25
AMI-SUL-FLU	O	0,5	4	12,5
AMI-SUL-POL	P	0,5	4	12,5
AMI-FLU-POL	Q	0,5	1	3,125

\*PEN: Penicilina (Amoxicilina + ácido clavulânico); CEF: Cefalosporinas (Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftiofur); FLU: Fluorquinolona (Enrofloxacina); AMI: Aminoglicosídeos (Gentamicina); SUL: Sulfonamida (Trimetopim + sulfametazol); POL: Polimixina (Colistina).

### 3.5 Teste de formação de biofilme

Das 88 cepas avaliadas, 35% (31/88) foram fortemente formadoras de biofilmes (FTFB) e somente 4,54% (4/88) das cepas não demonstraram capacidade de formar biofilmes (NFB) (Tabela 6).

Em relação às marcas nota-se que os isolados das marcas C e D foram 100% formadores de biofilme, e que 40% (6/15) e 41% (15/36) das cepas destas duas marcas tem uma alta capacidade de formar biofilmes. Contudo, todas as marcas estudadas apresentaram um alto percentual de cepas formadoras de biofilme.

**Tabela 6** – Capacidade de formar biofilme das cepas isoladas por marca e percentual total do grau de formação de biofilme\*.

<b>Grau de formação de biofilme</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Total</b>	
NFB	2	2	0	0	4	4,54%
FFB	6	2	4	10	22	25%
MFB	8	7	5	11	31	35,22%
FTFB	5	5	6	15	31	35,22%

\*NFB: não formadora de biofilme; FFB: fraca formadora de biofilme; MFB: moderada formadora de biofilme; FTFB: Forte formadora de biofilme.

### 3.6 Pesquisa de genes de resistência relacionados a ESBLs

A partir dos 15 isolados produtores de ESBLs no teste de disco-aproximação pode-se observar que o gene mais prevalente foi o *bla*TEM-1, presente em 73,33% (11/15) das amostras e o segundo gene mais prevalente foi o *bla*SHV-1, com 46,66% (7/15). Para os outros genes testados (*bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1, *bla*CMY-2 e *AmpC*), somente uma amostra foi positiva para o gene *bla*CMY-2.

Quando observada a presença de genes entre as marcas estudadas, todos os isolados da marca D apresentaram pelo menos um gene presente, sendo que na amostra 247 observou-se a presença dos genes *bla*SHV-1 e *bla*TEM-1. Este mesmo comportamento foi observado para a

amostra 241 da marca A, amostras 41 e 307 da marca B e amostras 294, 299 e 300 da marca C (Tabela 7).

**Tabela 7** – Genes de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) em isolados de *E. coli* conforme as marcas testadas.

		Genes de ESBLs detectados na PCR						
Marca	Amostras	<i>bla</i> CMY-2	<i>bla</i> SHV-1	<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CTX-M2	<i>bla</i> OXA-1	<i>bla</i> PSE-1	<i>AmpC</i>
A	39							
A	40							
A	241		X	X				
A	256							X
B	41		X	X				
B	307		X	X				
C	31							
C	32							
C	257							X
C	294		X	X				
C	299		X	X				
C	300	X						X
D	247		X	X				
D	252		X	X				
D	301							X

### 3.7 Pesquisa de genes de adesinas relacionados a produção de biofilme

As 31 cepas classificadas como fortemente formadoras de biofilmes foram submetidas à pesquisa de genes relacionados às adesinas bacterianas. Os genes *fimC*, *crl* e *papG* foram encontrados em 83,87% (24/31), 64,51% (20/31), e 77,41% (24/31) das cepas, respectivamente. Os genes *sha/foc*, *iha*, *felA* e *fimH* não foram detectados (Tabela 8).

A marca A teve maior prevalência dos genes *fimC*, *crl* e *papG*, assim como a marca B e a D. A marca C teve uma maior variação de genes, sendo os genes *hrla*, *fimC* e *papG* os mais prevalentes, apresentando ainda o gene *afa/dra*, o único isolado positivo para este gene observado no estudo.

**Tabela 8** – Genes relacionados à adesinas encontrados por marca em cada cepa classificada como fortemente formadora de biofilme.

Marca	Amostra	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>Iha</i>	<i>hrl</i> <i>a</i>	<i>fimC</i>	<i>pap</i> <i>C</i>	<i>ts</i> <i>h</i>	<i>ma</i> <i>t</i>	<i>crl</i>	<i>fel</i> <i>A</i>	<i>papG</i>	<i>fim</i> <i>H</i>
A	27					X				X		X	
A	37					X				X			
A	38					X		X		X		X	
A	202									X			
A	242					X		X		X		X	
B	43												
B	204					X				X		X	
B	255					X						X	
B	313					X			X	X		X	
B	315					X						X	
C	207												
C	257					X		X				X	
C	290				X	X	X			X		X	
C	295				X	X						X	
C	297		X		X	X		X	X	X		X	
C	299					X			X	X		X	
D	6					X						X	
D	16												
D	21											X	
D	30					X						X	
D	33				X	X						X	
D	205					X				X		X	
D	206					X				X			
D	250					X				X		X	
D	252				X	X				X		X	
D	254					X			X	X		X	
D	301					X			X	X		X	
D	302				X	X				X			
D	303					X				X		X	
D	304					X				X		X	
D	305					X			X	X		X	

#### 4. Discussão

A presença de bactérias resistentes em produtos alimentares é um problema de saúde pública e de preocupação mundial diante do potencial de transferência de agentes patogênicos

resistentes aos antimicrobianos para os humanos (Pavlickova et al., 2017). Esse fator é ainda mais importante quando se trata da carne de frango brasileira, uma vez que o Brasil exportou 4.384 mil toneladas de carne de frango em 2016, e que 59% destes eram cortes de carne de frango (ABPA, 2017).

Quando comparado com estudos realizados no Sudoeste da Ásia, o isolamento de *E. coli* em 39% das amostras (Trongjit et al., 2016) revela um percentual menor de isolamentos, já que obtivemos 58%, sendo este último resultado semelhante ao encontrado por Machado et al. (2017) (60%), porém menor do que encontrado por Kobayashi et al. (2011) (80%), ambos de análises de carcaças de carnes produzidas no Brasil. Este fato é preocupante uma vez que a *E. coli* pode ser considerada uma bactéria zoonótica, capaz de causar sérias infecções em humanos (Mitchell et al., 2015) embora sua presença é permitida pela legislação brasileira vigente. O agravo se dá ao notarmos a alta porcentagem de resistência, sendo que 73,86% destas cepas foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados.

Os diferentes perfis de resistência encontrados entre as marcas estudadas podem estar relacionados ao uso diferenciado destes fármacos pelas agroindústrias, sendo que cada uma prefere uma ou outra classe de antimicrobianos. Além disso, observa-se uma nova fase de adaptação das empresas na questão da utilização racional dos antimicrobianos.

A resistência encontrada é relevante já que cerca de 36% dos isolados foram considerados multirresistentes. Além disso, o IRMA apresentado por estas amostras foi acima de 0,5 e valores acima de 0,2 já são considerados de alto risco de transmissão para seres humanos (Krumperman, 1983).

Além da multirresistência, outro fato que chama a atenção no estudo é a produção de enzimas responsáveis pela disseminação global das infecções por *E. coli* resistentes às cefalosporinas de espectro estendido na última década, as ESBLs, que vêm se tornando uma das maiores ameaças para a saúde humana (Lazanus et al., 2015). Das cepas isoladas, 17% foram classificadas como produtoras de beta-lactamases no estudo, dado preocupante e já reportado em outros países (Abdallah et al., 2015; Doi et al., 2010). Análises de comparação da sequência genética feitas em estudos de similaridades do gene *bla*CMY-2 de isolados de *E. coli* de humanos e de aves demonstram alta similaridade (Berg et al., 2017). Como uma amostra foi positiva para o gene *bla*CMY-2, deve-se atentar para a possível capacidade de transmissão de genes de resistência através da carne consumida.

Ao contrário do que foi constatado em carnes brasileiras importadas pelo Reino Unido, em que detectou-se o gene *bla*CTX-M2 em quatro isolados (Warren et al., 2008), esse gene não foi encontrado nas amostras avaliadas, indicando assim que pode haver uma relação deste resultado com a redução do uso dos antimicrobianos, contribuindo com a menor dispersão das ESBLs.

O gene mais prevalente no experimento foi o *bla*TEM-1, também encontrado por Soufi et al. (2009) em *E. coli* e por Giuriatti et al. (2017) em isolados de *Salmonella* Heidelberg. O aumento da resistência às cefalosporinas de terceira geração, assim como da distribuição de genes de ESBLs é associado principalmente ao uso destes antimicrobianos em incubatórios, seja na aplicação *in ovo* ou em pintinhos de um dia como forma de controle da onfalite em frangos de corte (Baron et al., 2014).

As bactérias formadoras de biofilmes são um risco para saúde pública, uma vez que podem aderir-se em condições de nutrientes e fatores ambientais diversos, sendo que estudos já comprovam que sua remoção de plantas de processamento de carnes é dificultada, podendo permanecer como contaminante por longos períodos (Dewanti and Wong, 1995). As amostras isoladas no estudo demonstraram um importante perfil de formação de biofilmes, sendo que 70% das amostras foram moderadas a fortemente formadoras de biofilmes, fato semelhante aos achados em cepas oriundas de humanos (Naves et al., 2008) e de aves (Skyberg et al., 2007). Uma vez que a adesão dessas células influencia no processo de colonização das superfícies abióticas, pode-se até mesmo reduzir algumas rotas de transmissão deste agente contaminante ao longo da cadeia alimentar (Cookson et al., 2002). Sendo assim, a detecção dos genes de adesinas demonstra um perfil voltado para a capacidade de aderir e de colonizar superfícies abióticas.

O gene *fimC* foi o mais prevalente, fato semelhante ao encontrado por Jansen et al. (2001). A associação deste gene com outros, como *papG*, *tsh* e *crl* caracterizam-se como fatores comuns encontrados em isolados de APEC (Mellata et al., 2003).

Um dos genes mais prevalentes encontrado foi o *crl*, o qual está diretamente relacionado com a mutação *ompR*, que aumenta a produção da adesina “*curly*” ou ondulada, aumentando também a probabilidade de interações produtivas entre a *E. coli* e as superfícies abióticas (Danese et al., 2000). Outros genes detectados também estão relacionados à capacidade de adesão das fímbrias P e do tipo 1.

A presença dos genes de patogenicidade e adesinas são achados importantes, uma vez que o gene *afa/dra*, no conhecimento dos autores, é pela primeira vez relatado em carnes de frango brasileiras. Este gene é geralmente encontrado somente em isolados de *E. coli* em humanos (Aslam et al., 2014), sendo responsável por alterações que podem desencadear lesões nas microvilosidades da bexiga e a invasão de bactérias nas células epiteliais (Keller et al., 2002), demonstrando assim, o caráter zoonótico das cepas isoladas.

Além do alto percentual de isolamento, as cepas de *E. coli* apresentaram ainda resistência aos antimicrobianos, produção de ESBLs e de biofilmes, o que leva a crer que estas podem disseminar genes de resistência e de patogenicidade através de elementos móveis, tornando a carne de frango veículo de possíveis zoonoses.

## 5. Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que as cepas de *E. coli* isoladas de cortes de carne de frango possuem um importante perfil de resistência e patogenicidade, uma vez que além de serem produtoras de beta-lactamases de espectro estendido são também produtoras de biofilmes, o que pode levar a uma maior permanência destes organismos em plantas frigoríficas, servindo como contaminantes e multiplicadores de resistência aos alimentos ali processados. Nosso estudo ainda demonstra a presença dos genes de patogenicidade, especialmente o gene *afa/dra*, geralmente relatado somente em cepas isoladas de humanos, demonstrando um perfil zoonóticos nas cepas isoladas de cortes de carne de frango e a inter-relação entre homem-animal-ambiente na disseminação de elementos móveis carreadores de resistência e patogenicidade, acarretando maior risco à saúde humana.

## Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro fornecido pela FAPESC e CNPq. Ainda agradecemos o suporte oferecido pela Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia.

## Referências utilizadas no artigo

- Abdallah, H.M., Reuland, E.A., Wintermans, B.B., Al Naiemi, N., Koek, A., Abdelwahab, A.M., Ammar, A.M., Mohamed, A.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 2015. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or carbapenemases-producing Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Zagazig, Egypt. PLoS ONE 10, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0136052
- ABPA, 2017. Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 68.
- Alcaine, S.D., Sukhnanand, S.S., Warnick, L.D., Su, W.-L., Mcgann, P., Mcdonough, P., Wiedmann, M., 2005. Ceftiofur-Resistant Salmonella Strains Isolated from Dairy Farms Represent Multiple Widely Distributed Subtypes That Evolved by Independent Horizontal Gene Transfer. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 4061–4067. doi:10.1128/AAC.49.10.4061–4067.2005
- ANVISA, 2003. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. doi:M02-A11
- Aslam, M., Toufeer, M., Narvaez Bravo, C., Lai, V., Rempel, H., Manges, A., Diarra, M.S., 2014. Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. International Journal of Food Microbiology 177, 49–56. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.006
- Baron, S., Jouy, E., Larvor, E., Eono, F., Bougeard, S., Kempf, I., 2014. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58, 5428–5434. doi:10.1128/AAC.03106-14
- Berg, E.S., Wester, A.L., Ahrenfeldt, J., Mo, S.S., Slettemeås, J.S., Steinbakk, M., Samuelsen, Grude, N., Simonsen, G.S., Løhr, I.H., Jørgensen, S.B., Tofteland, S., Lund, O., Dahle, U.R., Sunde, M., 2017. Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *IncK/blaCMY-2* resistance plasmids. Clinical Microbiology and Infection 23, 407–415. doi:10.1016/j.cmi.2016.12.035
- Berlanga, M., Guerrero, R., 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its

- biotechnological implications. *Microbial Cell Factories* 15, 165. doi:10.1186/s12934-016-0569-5
- Borsoi, A., Santin, E., Santos, L.R., Salle, C.T.P., Moraes, H.L.S., Nascimento, V.P., 2009. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poultry Science* 88, 750–758. doi:10.3382/ps.2008-00466
- Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., Meng, J., 2004. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1–7. doi:10.1128/AEM.70.1.1-7.2004
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2018.
- Cookson, A.L., Cooley, W.A., Woodward, M.J., 2018. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *International Journal of Medical Microbiology* 292, 195–205. doi:10.1078/1438-4221-00203
- Cunha, M.P. V., Menão, M.C., Ferreira, a. J.P., Knöbl, T., 2013. A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humana e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia* 11, 24–33.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., Kolter, R., 2000. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* 37, 424–432. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x
- Dewanti, R., Wong, A.C.L., 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 26, 147–164. doi:10.1016/0168-1605(94)00103-D
- Doi, Y., Paterson, D.L., Egea, P., Pascual, A., López-Cerero, L., Navarro, M.D., Adams-Haduch, J.M., Qureshi, Z.A., Sidjabat, H.E., Rodríguez-Baño, J., 2010. Extended-spectrum and CMY-

type  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 33–38. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03001.x

Downes, F.P.; Ito, H. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 676p.

Frye, J.G., Fedorka-Cray, P.J., 2007. Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 134–142. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.03.013

Giuriatti, J., Stefani, L.M., Brisola, M.C., Crecencio, R.B., Bitner, D.S., Faria, G.A., 2017. *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Microbial Pathogenesis* 109, 195–199. doi:10.1016/j.micpath.2017.05.040

JANSEN, T., SCHWARZ, C., PREIKSCHAT, P., VOSS, M., PHILIPP, H.-C., WIELER, L.H., 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 371–378. doi:10.1078/1438-4221-00143

Keller, R., Ordoñez, J.G., De Oliveira, R.R., Trabulsi, L.R., Baldwin, T.J., Knutton, S., 2002. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 70, 2681–2689. doi:10.1128/IAI.70.5.2681-2689.2002

Kobayashi, R.K.T., Aquino, I., Ferreira, A.L. da S., Vidotto, M.C., 2011. EcoR Phylogenetic Analysis and Virulence Genotyping of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains and *Escherichia coli* Isolates from Commercial Chicken Carcasses in Southern Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 631–634. doi:10.1089/fpd.2010.0726

Krumperman, P.H., 1983. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify {High-Risk} Sources of Fecal Contamination of Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165–170. doi:10.1007/s11356-014-3887-3

Lazanus, B., Patersin, D.L., Mollinger, J.L., Rogers, B.A., 2015. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-

producing animals? A systematic review. *Clinical Infectious Diseases* 60, 439–452. doi:doi:10.1093/cid/ciu785

Lezameta, L., Gonzáles-Escalante, E., Tamariz, J.H., 2010. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 27, 345–351. doi:10.1590/S1726-46342010000300006

Machado, I.A., Okamoto, A.S., Rocha, N.S., Okamoto, A.S., 2017. Occurrence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* in Chicken Carcasses. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology* 6, 346–355. doi:10.23953/cloud.ijavst.331

Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R., Lehoux, B., Fairbrother, J.M., 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* 71, 494–503. doi:10.1128/IAI.71.1.494-503.2003

Mitchell, N.M., Johnson, J.R., Johnston, B., Curtiss, R., Mellata, M., 2015. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1177–1187. doi:10.1128/AEM.03524-14

Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M.C., Soriano, F., 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology* 105, 585–590. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x

Pavlickova, S., Klančnik, A., Dolezalova, M., Mozina, S.S., Holko, I., 2017. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 52, 570–576. doi:10.1080/03601234.2017.1318637

Shin, S.W., Shin, M.K., Jung, M., Belaynehe, K.M., Yoo, H.S., 2015. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 5560–5566. doi:10.1128/AEM.01511-15

Skyberg, J.A., Siek, K.E., Doetkott, C., Nolan, L.K., 2007. Biofilm formation by avian

*Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *Journal of Applied Microbiology* 102, 548–554. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03076.x

Soufi, L., Abbassi, M.S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C., 2009. Prevalence and Diversity of Integrons and Associated Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Poultry Meat in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 1067–1073. doi:10.1089/fpd.2009.0284

Souza, I.J.G. de S., Pinheiro, R.E.E., Maria, A., Rodrigues, D., Júnior, M.H.K., Peneluc, T., 2016. Condições não patológicas de carcaças de frangos em um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no estado do Piauí. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 10, 68–77.

Stepanović, S., Vukovic, G., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40, 175–179. doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6

Trongjit, S., Angkittitrakul, S., Chuanchuen, R., 2016. Occurrence and molecular characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from broilers, pigs and meat products in Thailand and Cambodia provinces. *Microbiology and Immunology* 60, 575–585. doi:10.1111/1348-0421.12407

Warren, R.E., Ensor, V.M., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D.M., Woodford, N., Hawkey, P.M., 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 504–508. doi:10.1093/jac/dkm517



### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as cepas de *E. coli* isoladas de cortes de carne de frango possuem a capacidade de formar biofilme, um relevante perfil fenotípico e genotípico de resistência frente aos mais importantes antibióticos utilizados na medicina humana e veterinária, além de um alto potencial de disseminação para humanos. A união dessas características nos leva a crer que a disseminação destas cepas no ambiente é altamente danosa tanto à saúde do homem como dos animais. Importante enfatizar a necessidade do uso racional dos antibióticos, aprimoramento das técnicas de sanitização da indústria alimentícia, e campanhas de conscientização aos consumidores envolvendo o adequado preparo dos alimentos.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Avicultura: Relatório Anual 2016. 2017. Disponível em < <http://abpa-br.com.br/> >. Acesso em 19 de outubro de 2017.
- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837, 1940.
- AMBLER, R. P. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, v. 276, n. 1, p. 269, 1991.
- AMBLER, R. P. The Structure of beta-Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ARAÚJO, P. et al. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Formatex, Badajoz, p. 826-834, 2011.
- BAJAJ, P. et al. *Escherichia coli* beta-lactamases: what really matters. **Frontiers in Microbiology**, n 7, p. 1-14, 2016.
- BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia**, Lisboa, 2013.
- BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 347-357, 2008.
- BERLANGA, M.; GUERRERO, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 165, 2016.
- BERG, E. S. et al. Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *IncK/blaCMY-2* resistance plasmids. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 6, p. 407, 2017.

BIN, C. et al. Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M–type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase–producing *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 4, p. 351-357, 2006.

BLUMER, C. et al. Regularion of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *E. coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3287-3298, 2005.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum Beta-lactamases in the 21 st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.933-951, 2001.

BRASIL, Governo do Estado de Santa Catarina. Secretaria do Estado da Agricultura e da Pesca. 2017. Disponível em <<http://www.agricultura.sc.gov.br/index.php/noticias>>. Acesso em 19 de agosto de 2017.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 969–976, 2010.

BUSH, L. M.; CALMON, J.; JOHNSON, C. C. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 9, n. 3, p. 653, 1995.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal Medical Microbiology**, v. 303, p. 298–304, 2013.

CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 2003.

COOKSON, A. L.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, Martin J. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in agherence to abiotic surfaces. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n.3-4, p.195-205, 2002.

CONSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v.41, n.1, p.435-464, 1987.

CONSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

CONSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

DANESE, P. N. et al. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 424-432, 2000.

DE SALES SOUZA, I. J. G. et al. Condições não patológicas de carcaças de frangos em um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no estado do Piauí. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 68-77, 2016.

DEWANTI, R.; WONG, A. C. L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 147-164, 1995.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. IN: BERCHIERI JR., A; SILVA, E.N., DI FABIO, J.; SEST, L.; ZUANAZE, M.A. **Doenças das Aves**, 2ª. Ed. Campinas: FACTA, 1102 p. 2009.

GIRÃO, D. M. et al. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, 1297 p., 2006.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. INN: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 643 p., 2010.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1050-1051, 2005.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 916–21, 2009.

HUSSEIN, A. H. M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. **Avian Diseases**, v. 57, n. 3, p. 602-611, 2013

JOHNSON, T. J. et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7043-7050, 2008.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

KLEVENS, R. M. et al. For the active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of America Medical Association**, v. 298, p. 1763–1771, 2007.

KNÖBL, T. et al. A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 2, p. 24-33, 2013.

KNOX, J. R. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2593, 1995.

KOGA, V. L. et al. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 6, p. 479-485, 2015.

KONG, K. F.; SCHNERPER, P.; MATHEL, J. Beta-lactam antibiotics: from antibiotics to resistance and bacteriology. **National Institute of Health**, v. 118, p. 1–36, 2010.

KUMAR, A. et al. Biofilms: survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, 2017.

LAMBERT, M. L. et al. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 30–38, 2011.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance - the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, p. 1057-98, 2013.

LAZARUS, B. et al. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 3, p. 439-452, 2015.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **Wallingford: Cab International**, p. 31-72, 1994.

MANGES, A. R. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 122-129, 2016.

MARTÍNEZ, J. M. R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 13–29, 2016.

MATTILA-SANDHOLM, Tiina; WIRTANEN, Gun. Biofilm formation in the industry: a review. **Food Reviews International**, v. 8, n. 4, p. 573-603, 2012.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature**, v. 4, p. 608-620, 2006.

MENG, J., FENG, P., DOYLE, M. P. Capítulo 35: Pathogenic *Escherichia coli*, p. 331-341. INN: **Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods**. Fourth Edition. American Public Health Association. 2001.

MITCHELL, Natalie M. et al. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 1177-1187, 2015.

MITTELSTAEDT, S., CARVALHO, V. M. de. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7-revisão. **Journal Health Science Institute**, v. 24, n. 3, 2006.

NEUPANE, S. et al. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extend spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, n.1, p.5, 2016

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) Pathogenesis. INN: PADOLA, N. L., ETCHEVERRÍA, A. Shiga Toxin-Producing *E. coli* in Human, Cattle and Foods. Strategies for detection and control **FRONTIERS: Reserch Topics**. 2012.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 478, 2011.

OVERDEVEST, I. et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes of *Escherichia coli*. In: Chicken Meat and Humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1216-22, 2011.

PATERSON, D. L. et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2206-2212, 2001.

PUPO, M. T. et al. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry: Taft, C. A. **Research Signpost: Kerala**, 2006.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre; Artmed, 512 p., 2005.

RABIN, Nira et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. **Future**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RODRIGUES, L. B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. Vol. 37, n. 3 (2009), p. 225-230, 2009.

ROUSSEL, C. et al. Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*: from gut pathogenesis to new preventive strategies involving probiotics. **Future Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 73-93, 2017.

ROWE-MAGNUS, D. A.; MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 115–125, 2002.

SACHS, J. L.; HOLLOWELL, A. C. The origins of cooperative bacterial communities. **Medical Biology**, v. 3, n. 3, p. 09-12, 2012.

SCHMOLL, Thomas et al. Use of a wild-type gene fusion to determine the influence of environmental conditions on expression of S fimbrial adhesion in an *Escherichia coli* pathogen. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n.9, p. 5103-51111, 1990.

SHAH, A. A. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2004.

SHIN, S. W. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* Isolates from beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 5560-5566, 2015.

SINGER, R. S. et al. Antibiotic resistance: the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 47-51, 2013.

SIROT, D. et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, n. 3, p. 323-334, 1987.

SOJKA, W.J. Enteric diseases in new-born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. **Vet. Bull., Weybridge**, v. 41, p. 509-522, 1971.

SOJKA, W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. **England: Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal**, p. 184-214, 1965.

SOUGAKOFF, W. et al. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. **Review of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 879-884, 1988.

SOUZA, L. H. L. A manipulação inadequada dos alimentos: Fator de contaminação. Higiene de alimentos. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 20, n. 146, 2016. Disponível em: <[http://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos05/42\\_artigo%20seget.pdf](http://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos05/42_artigo%20seget.pdf)>. Acesso em 20 de outubro de 2017.

SREY, S.; JAHID, I. K. ; HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, p. 1669–1683, 1989.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705

STÜRENBURG, E. et al. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 1, p. 51-55, 2005.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.

VERCAUTEREN, E. et al. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2191-2197, 1995.

WOODFORD, N. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae from animal and the environment: an emerging public health risk of our own making. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 287-91, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 2014.

XU, L. et al. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 505–511, 2011.